

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月29日

出願番号
Application Number: 特願2004-096215
[ST. 10/C]: [JP 2004-096215]

REC'D 04 NOV 2004	
WIPO	PCT

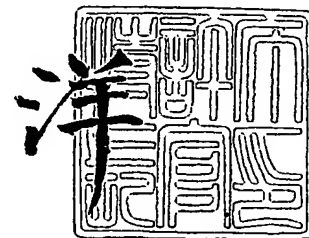
出願人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



特願 2004-000210

【書類名】 特許願
【整理番号】 040329P06
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K
C12N

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
【氏名】 松山 玲子

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
【氏名】 前田 浩明

【特許出願人】
【識別番号】 000173555
【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
【代表者】 内野 矜自

【代理人】
【識別番号】 100081581
【弁理士】
【氏名又は名称】 内山 美奈子
【電話番号】 06-6343-0160

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-282033
【出願日】 平成15年 7月29日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056568
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316563

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

フィブリノゲンを高産生する組換えフィブリノゲン産生細胞を作製する方法であって、フィブリノゲンを構成するポリペプチドである α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖及び γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を、 γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数の1～1000倍量となるように、動物細胞に組込むことを特徴とする組換えフィブリノゲン高産生細胞作製方法。

【請求項 2】

γ 鎖遺伝子の数が α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数と同じであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を有するベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターとを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を各1個ずつ有するベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を各1個ずつ有する発現ベクターとを等量混合して用いることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項 5】

図1に記載の発現ベクターpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを等量混合し、これを動物細胞に組込むことを特徴とする請求項1ないし4の何れかに記載の方法。

【請求項 6】

α 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子を有するベクターと γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターとを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 7】

α 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクター、 β 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクター及び γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 8】

SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター及びニワトリ β -アクチンプロモーターからなる群より選択されるプロモーター並びにアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子及びグルタミン合成酵素(GS)遺伝子からなる群より選択される遺伝子増幅用マーカー遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項1ないし7の何れかに記載の方法。

【請求項 9】

ニワトリ β -アクチンプロモーター及びジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項 10】

α 鎖をコードする遺伝子として、 α 鎖をコードする遺伝子及びその異型である α E鎖をコードする遺伝子の両方もしくは何れか片方を組み込むことを特徴とする請求項1ないし9の何れかに記載の方法。

【請求項 11】

γ 鎖をコードする遺伝子として、 γ 鎖をコードする遺伝子及びその異型である γ' 鎖をコードする遺伝子の両方もしくは何れか片方を組み込むことを特徴とする請求項1ないし9の何れかに記載の方法。

【請求項 12】

γ 鎖をコードする遺伝子として、 γ 鎖をコードする遺伝子及びその異型である γ' 鎖をコードする遺伝子の両方もしくは何れか片方を組み込み、且つ、 α 鎖をコードする遺伝子として、 α 鎖をコードする遺伝子及びその異型である α E鎖をコードする遺伝子の両方もしくは

は何れか片方を組み込むことを特徴とする請求項 1 ないし 9 の何れかに記載の方法。

【請求項 13】

動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巢細胞(CHO細胞)、マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞及びCOS細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ないし 12 の何れかに記載の方法

【請求項 14】

チャイニーズハムスター卵巢細胞(CHO細胞)がDG44株であることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

フィブリノゲンを高産生する組換えフィブリノゲン産生細胞を作製する方法であって、請求項 1 から 14 の何れかに記載の組換えフィブリノゲン高産生細胞作製方法に加えて、フィブリノゲンを構成するポリペプチドをコードする遺伝子と同時又は異なる時期に、バキキュロウイルスP35遺伝子を動物細胞に組み込むことを特徴とする組換えフィブリノゲン高産生細胞作製方法。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 15 の何れかに記載の方法により得られた組換えフィブリノゲン高産生細胞。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法によって得られた組換え動物細胞を用いてアポトーシスを誘導しない条件下の培養方法で培養することによりフィブリノゲンを大量産生する方法。

【請求項 18】

請求項 16 記載の組換え動物細胞を用いたフィブリノゲンの大量産生する方法において、フェドバッチ培養方法、灌流培養方法、栄養強化培地を用いた培養方法の何れかで培養することを特徴とするフィブリノゲンを大量産生する方法。

【請求項 19】

請求項 16 記載の組換え動物細胞を用いたフィブリノゲンを大量産生する方法において、無血清培地を用いることを特徴とするフィブリノゲンを大量産生する方法。

【請求項 20】

フィブリノゲンの産生量を約4000 μ g/mlまで増加させ得ることを特徴とする請求項 17 ないし 19 の何れかに記載のフィブリノゲンを大量産生する方法。

【請求項 21】

請求項 16 記載の組換えフィブリノゲン高産生細胞を用いて産生されたフィブリノゲン。

【請求項 22】

請求項 17 ないし 20 の何れかに記載の方法を用いて産生されたフィブリノゲン。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組換えフィブリノゲン高産生細胞の作製方法及び高産生細胞

【技術分野】

【0001】

本願発明は、血漿タンパク質の一つであるフィブリノゲンを多量に生産する組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法に関する。更に詳細には、フィブリノゲンを構成する3種のタンパク質、 α 鎖（もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖及び γ 鎖（もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を、それぞれの構成比が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から1000倍量となるように、動物細胞に組込む工程、さらには産生量増強因子を組み込む工程を含む当該組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法及び当該方法により得られる組換えフィブリノゲン高産生細胞、及びこれらにより得られたフィブリノゲンに関する。

【背景技術】

【0002】

フィブリノゲンは、血液凝固因子の一つとして、生体が傷害を受けた時に血液を凝固する働きを担う。第一の機能は損傷部位でフィブリンクロットと呼ばれる血栓の本体を形成することであり、第二の機能は、血小板凝集に必要な粘着タンパク質として働くことである。フィブリノゲンの血中濃度は、通常約3mg/mlであり、アルブミン、免疫グロブリンGについて3番目に高い。

【0003】

フィブリノゲンは、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖と呼ばれる3種の異なったポリペプチドを2本ずつ有する計6本のポリペプチドからなる巨大糖蛋白質である。ポリペプチドの個々の分子量は α 鎖が約67000、 β 鎖が約56000、 γ 鎖が約47500であり、これらが集合したフィブリノゲンの分子量は、約340000に達する（非特許文献1参照）。フィブリノゲン分子は、S-S結合した α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の半分子（ $\alpha-\beta-\gamma$ ）が、さらにS-S結合したダイマー（ $(\alpha-\beta-\gamma)_2$ ）を形成しており、形状的には3つのノジュラー（結節・球状）構造を有している。すなわち、中央のE領域とその両外側に対称的に配置された2つのD領域、その間をつなぐ桿状部からなる構造をとっている。

【0004】

血中のフィブリノゲンには、分子サイズの異なる異型ポリペプチドを有することに起因するヘテロな分子が存在する。例えば、 γ 鎖には γ' 鎖（あるいは γ B鎖）と呼ばれる異型の存在が報告されており、これは、 γ 鎖のアミノ酸配列の408位に20個のアミノ酸残基が付加した計427個のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが明らかにされている（非特許文献2参照）。また、 α 鎖にも α Eと呼ばれる異型が存在し、このポリペプチドは、 α 鎖のアミノ酸配列の612位に236個のアミノ酸残基が伸長した計847個のアミノ酸残基を有することが報告されている（非特許文献3参照）。 γ' や α Eを有するヘテロなフィブリノゲンは、通常のフィブリノゲンと比較して、その凝固能、線溶耐性能に顕著な差は認められない。しかしながら、これらの分子種については研究段階にあり、未だ詳細な機能は解明されていない。

【0005】

フィブリノゲン製剤は、静脈投与するなどの方法により血液中のフィブリノゲン濃度を高めることによって重篤な出血を阻止するのに効果的であり、たとえば敗血症における汎発性血管内凝固症候群（DIC）のような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。

また、フィブリンの膠着性を利用した組織接着剤としても広く利用されている（非特許文献4参照）。この生体由来接着剤は、フィブリノゲンが生体内でゲル化することを利用したもので、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアリークの閉鎖など広範にわたって使用される。また、近年フィブリノゲンをコラーゲンなどのシートに付着させることにより利便性を高めた製剤も販売されている。

【0006】

現在、医薬品として用いられているフィブリノゲンはヒト血漿から調製されたもので、その問題点として、1) 不特定多数のヒトから集めた血漿を使用するために、HAV、HBV、HCV、HEV、TTVなどの肝炎を引き起こすウイルス、HIVなどの免疫不全症を引き起こすウイルス、CJDを引き起こす異常プリオンなどの感染性病原体混入の危険性があること、2) また、日本では血漿は献血によって供給されており、将来的な安定供給が問題視されること、などが挙げられている。

これらの問題を解決するために、従来からフィブリノゲンの組換え化が試みられてきた。例えば、大腸菌では、フィブリノゲン γ 鎖の菌体内発現には成功しているが、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3つのタンパク質を同時に発現させ、機能的なフィブリノゲン分子を産生させたとの報告はない。また、酵母を用いた発現系でも一時期分泌発現に成功したとの報告もあったが、最終的には再現性が取れずその報告を取り下げている（非特許文献5参照）。このように、未だ、大腸菌や酵母を用いてフィブリノゲンを発現させることに成功したとの報告はない。

【0007】

一方、動物細胞では、BHK細胞（非特許文献6参照）やCOS細胞（非特許文献7参照）、CHO細胞（非特許文献8、9、10及び特許文献1参照）を用いて発現が試みられているが、その産生量は、1～15 μ g/ml程度にとどまっている。これらの場合、メタロチオネインプロモーター、Rous sarcoma virus LTRプロモーター、adenovirus 2 major late プロモーターの何れかを用い、選択マーカーとしてアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、histidinol耐性遺伝子の何れか若しくはこれらの組み合わせで使用している。いずれの場合も、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖を各々コードする遺伝子の発現ベクターを各々単独に構築し、3者で同時にトランスフェクションするか、あるいは α 鎖、 γ 鎖若しくは β 鎖、 γ 鎖遺伝子を有する各々2つの発現ベクターで先に形質転換した細胞に、後から β 鎖、 α 鎖遺伝子を有する発現ベクターを導入する方法、さらには α 鎖と γ 鎖遺伝子を有するプラスミドと β 鎖遺伝子を有するプラスミドを等量混合して導入する方法がとられている。いずれの場合も特に導入する際の各遺伝子の構成比に関する記載はなく、一般的な手法通りに各遺伝子を均等に導入していると思われる。現在使用されている血液由来のフィブリノゲンを用いた医薬品では、例えば、フィブリン糊製剤では約80mg/doseのフィブリノゲンが使われており、前述の十数 μ g/ml程度の発現量では製造施設が大規模にならざるを得ず、必然的に高コストになってしまう。遺伝子組換え技術によりフィブリノゲンを実用的なレベルで製造するためには高産生細胞（例えば、フィブリノゲンの発現量が100 μ g/ml以上）が必要であるが、現在、これを満足する組換え動物細胞を用いた発現系の報告はみられない。

【0008】

一方、組換えフィブリノゲン産生細胞を培養する場合には、通常の動物細胞の培養と同様の問題点が考えられる。一般的に、タンパク質が分泌タンパク質の場合、培養上清に目的タンパク質が回収できるので、適当な培地中で組換え動物細胞を培養し、一定期間培養した後、培養上清を一括して回収する（バッチ培養）か、随時適当量の培地の抜き取り、添加を連続的に行う方法（パフュージョン培養）が用いられている。いずれにしても、目的分泌タンパク質を産生する組換え動物細胞の数の増加とともに分泌タンパク質の培地への蓄積（産生）量が増加する。細胞の増殖は、細胞が対数的に増殖する対数期と細胞数が見かけ上一定の定常期、それから細胞が死滅し、数が減少する死滅期の3つの期間に分けられる。分泌タンパク質の産生を増加させるためには、定常期での組換え動物細胞の細胞密度を可能な限り高くし、その期間をできるだけ長く維持することが重要である。特に、バッチ培養の場合、一定量の培地の中で組換え動物細胞を増殖させるので、この中で分泌タンパク質の産生量を伸ばすために定常期の細胞密度を可能な限り高くし、なおかつその時期をできるだけ維持しようと様々な試みがなされてきた。

【0009】

このような育種的な方法とは別の方法として、宿主細胞を改造する試みも行われてきた

。例えば、細胞死抑制因子(anti-apoptotic factor)を用いる方法が試みられている。この方法は細胞死抑制因子遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞中で発現させ、その細胞に栄養飢餓などによって生じるプログラムされた細胞死(アポトーシス)を抑制する能力を付与し、定常期を延長しようという試みである。

【0010】

アポトーシスの起こるメカニズムとして非特許文献11によれば、次のように考えられている。栄養枯渇などの様々な細胞死刺激が細胞に伝わると転写因子やキナーゼを含む各種タンパク質を介して、そのシグナルはミトコンドリアに伝達される。シグナルを受けたミトコンドリアはアポトーシスシグナル伝達因子(AIF、シトクロムcなど)を細胞質中に放出する。シトクロムcは細胞質に存在するApaf-1(apoptosis activating factor-1)とpro-caspase-9に結合し複合体を形成し、caspase-9を活性化する。活性化されたカスパーカスケードは細胞質内あるいは核内の各種基質を切断し、様々なアポトーシスに特徴的な形態学的、生化学的変化(アクチン分解、DNA断片化、染色体凝集など)を誘導する。このようなアポトーシスを抑制する因子としてBcl-2(B cell lymphoma/leukemia 2)がよく知られている。Bcl-2遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫に高頻度に見られる癌遺伝子として発見された。現在Bcl-2に相同性の高いドメイン(BH1-4)をもつ多くのファミリー遺伝子が同定されている。ファミリーにはアポトーシスに抑制的に働く因子と促進的に働く因子があり、抑制的因子として、例えばBcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1、BHRF1、E1B-19K、Ced-9などが知られており、前述のシトクロムc放出阻害や、Apaf-1とprocaspase-9に結合することによってシグナル伝達を阻止していると考えられている。このように抑制的なBcl-2ファミリーはカスパーカスケードの上流で機能すると考えられている。

【0011】

一方、カスパーカスケードの下流に作用(カスパーの活性を直接的に阻害)して細胞死抑制効果を示す因子も知られている。例えば、バキュロウイルス科に属するAcNPV(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)のP35タンパク質はカスパーの基質として切断され、その断片がほとんど全てのカスパーと安定的な複合体を形成してその活性を阻害する。従って、種々のアポトーシスを抑制することができる。AcNPVに近縁なBmNPV(Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus)もP35遺伝子を持っている。また、牛痘ウイルスのcrmAはcaspase-1様プロテアーゼやcaspase-8、-10に特異的に結合し、これを阻害することによりアポトーシスを抑制できる。また、ヘルペスウイルス由来のv-FLIPは2つのDED(death effector domain)ドメインを持ち、FADD(Fas-associating Protein with death domain)と結合することによってcaspase-8の活性化を抑制する。

【0012】

さらに、バキュロウイルス科のCpGV(Cidra pomonella granulosis virus)やOpMNPV(Ornyia pseudotsugata multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus)をはじめとする多くの類縁のウイルスには、P35遺伝子とは別に、その発現産物がカスパー活性を直接阻害するv-IAP(inhibitor of apoptosis)遺伝子が同定されている。現在までにv-IAPのホモログとして、ウイルス以外にショウジョウバエや哺乳類でc-IAP1/hia-2、c-IAP2/hia-1、XIAP、NAIP、survivin、TIAP、Apollon、DIAP1、DIAP2、SfIAP、ITAなど数種類のBIR(baculovirus IAP repeat)を持つIAPファミリーが同定されている。

しかし、カスケードの上流に作用するBcl-2、Bcl-xL、E1B-19KなどのBcl-2ファミリー由来の細胞死抑制因子を用いた産生量増強方法はいずれも細胞死を抑制し、増殖曲線の定常期を延長することができたにもかかわらず、期待通りには産生量が増加しない場合が多かった。これらのことから、これらの因子には直接的なタンパク質の産生量を増強する効果はないか、あっても特殊な環境下で発揮されることが考えられる。一方、カスケードの下流に作用するカスパー阻害作用因子については、組換えタンパク質産生細胞において産生量増強効果との関連を調べたとの報告はほとんどなく、その効果については不明であった。

【特許文献1】 United States Patent 6037457

【非特許文献1】「止血・血栓・線溶」松田、鈴木編集、中外医学社(1994)

- 【非特許文献 2】 Chung DEとDavie EW, Biochemistry, 23, 4232 (1984)
- 【非特許文献 3】 Lawrence YFら, Biochemistry, 31, 11968, (1992)
- 【非特許文献 4】 「特集・生体接着剤」 Biomedical Perspectives, 6, 9-72 (1997)
- 【非特許文献 5】 Redman CM, Kudryk B., J. Biol. Chem., 274, 554 (1999)
- 【非特許文献 6】 Farrell DHら, Biochemistry, 30, 9414 (1991)
- 【非特許文献 7】 Roy SNら, J. Biol. Chem., 266, 4758 (1991)
- 【非特許文献 8】 Lord STら, Blood Coagul Fibrinolysis, 4, 55 (1993)
- 【非特許文献 9】 Binnie CGら, Biochemistry, 32, 107 (1993)
- 【非特許文献 10】 Lord STら, Biochemistry, 35, 2342 (1996)
- 【非特許文献 11】 「アポトーシスと疾患 中枢神経系疾患編」 水野美邦編、医薬ジャーナル(2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

以上述べてきたように、血液由来のフィブリノゲン製剤の製造・販売においては、感染性病原体の混入や市場への安定供給という点を危惧しなければならない。これらの問題点を解決する為に、遺伝子組換え技術によるフィブリノゲンの生産が試みられているが、これまでに報告されている発現量では、製造コストの面で実用化することが困難と予想され、改善・改良が望まれるところである。さらに、産生量増強に従来用いられてきた定常期延長因子の作用には不明なところが多く、その詳細な検討が要望されていた。

【0014】

したがって、本願発明は、ヒトフィブリノゲンを高発現する組換えヒトフィブリノゲン高産生細胞の作製方法を提供することを目的とする。

【0015】

また、本願発明の他の目的は、組換えフィブリノゲン高産生細胞の作製に当たり、バキュロウイルスP35による産生量増強作用の影響を解明し、フィブリノゲンの更なる産生量増強方法を提供することにある。

【0016】

さらに、本願発明の他の目的は、当該方法により得られる組換えヒトフィブリノゲン高産生細胞及びフィブリノゲンを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本願発明者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、ヒトフィブリノゲンを構成する3種のタンパク質のうち、 α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から1000倍量となるよう、例えば、 α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを等量混合し、これを用いて動物細胞を形質転換することにより、容易にヒトフィブリノゲンを高発現する組換え動物細胞を作製できることを見出し、本願発明を完成するに至った。

【0018】

従って、本願発明は、 α 鎖及び γ 鎖含有発現ベクターと β 鎖及び γ 鎖含有発現ベクターを等量混合した発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換する工程を含む組換えヒトフィブリノゲン高産生細胞の作製方法を包含する。

【0019】

さらに、本願発明者らは、別の角度から産生量増強を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、動物細胞にさらに、バキュロウイルスP35遺伝子を用いて形質転換させることにより、更なる産生量の増強が図れることを見出した。さらに、この産生量の増強は、この因子が産生量の増強要因としてタンパク質生合成活性の増強に寄与した場合と、アポトーシス活性阻害に寄与した場合との2通りが考えられることを明らかにし、前者の場合は、アポトーシスの発生時期まで待たなくとも産生量の増強が得られるため、培地を選ばず、産業

上の利用価値が非常に高いことが判明した。

【0020】

従って、本願発明は、フィブリノゲン産生細胞に同時または異なる時期にバキュロウイルスP35遺伝子を用いて形質転換させることにより、更なる産生量の増強を図ることができる組換えフィブリノゲン高産生細胞の作製方法を包含する。

【0021】

また、本願発明は、上記の方法により得られた、ヒトフィブリノゲンを高発現する組換えヒトフィブリノゲン高産生細胞及びフィブリノゲンを包含する。

【発明の効果】

【0022】

本願発明のヒトフィブリノゲンを構成する3種のタンパク質をコードした遺伝子の混合発現方法によれば、ヒトフィブリノゲンを高発現する組換え産生細胞及びその作製方法が提供される。その結果、約100~1520 μ g/mlの産生量をもたらされる。本願発明の組換えヒトフィブリノゲン産生細胞が生産するヒトフィブリノゲンの量は、これまでに報告されている遺伝子組換え技術によるフィブリノゲンの発現量（~15 μ g/ml）を大きく上回るものである。さらに、本願発明の産生量増強因子遺伝子による形質転換をおこなった場合は、704~3952 μ g/mlという従来技術による産生量を遙かに超えた産生量をもたらされ、今後市場への大量供給が可能となる。さらに、その培養方法には、限定がなく、アポトーシスの到来前でも産生量の増加が図れるので、短期間で大量の産生量を得ることが可能である。故に、本願発明の組換えヒトフィブリノゲン産生細胞は、実用的なレベルでのヒトフィブリノゲンの製造方法の確立を可能にし、当該製造方法が確立されることによってヒトフィブリノゲンの市場への安定供給が確保される。

【0023】

また、本発明方法より得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞を用いれば、従来の血液を原料として製造した場合に危惧される感染性病原体の混入やその他の血液由来成分の関与を排除することができ、より安全なヒトフィブリノゲン製剤を効率よく大量に製造・供給することが可能となる。このように本願発明の方法は、ヒト血漿由来以外のフィブリノゲンを高産生する組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法としても利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本願発明の方法は、フィブリノゲンを構成する3種の蛋白質、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を、各遺伝子の構成比が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から1000倍量となるように動物細胞に組込む工程を含む組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法によって特徴付けられる。さらに、産生量増強因子であるバキュロウイルスP35遺伝子による形質転換によって特徴付けられる。

本願発明では、主としてヒトのフィブリノゲンを取り扱うが、ヒトに限らず他の動物のフィブリノゲン産生細胞を作製する方法としても用いることができる。本願発明で用いるヒトフィブリノゲンの構成ポリペプチド、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子としては、最終的に発現産物がアッセンブルしてヒトフィブリノゲン分子を形成できる遺伝子であれば、cDNA及び染色体遺伝子の何れも使用できる。

前述したように、 α 鎖及び γ 鎖には、それぞれ α E鎖及び γ' （ γ B）鎖と呼ばれる異型が存在する。これらに加えて今後新たに見出されるかもしれない他の異型ポリペプチドをコードする遺伝子も、その発現産物がフィブリノゲン分子を構成するタンパク質として機能するならば、同様に、本願発明に使用することが可能である。

【0025】

所望の遺伝子は、例えば、文献（Rixon MWら、Biochemistry, 22, 3237 (1983)、Chung DWら、Biochemistry, 22, 3244 (1983)、Chung DWら、Biochemistry, 22, 3250 (1983)、非特許文献2、3参照）に各々報告されている配列を元にPCR用プライマーをデザイン

し、ヒト肝臓などフィブリノゲンを産生している臓器や細胞由来のcDNAを鋳型にしてPCRを行うことにより取得できる。

より具体的には、フィブリノゲンの α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖、 α E鎖及び γ' 鎖をコードするcDNAは、以下のように調製される。まず、ヒト肝細胞から全RNAを抽出し、この中からmRNAを精製する。得られたmRNAをcDNAに変換した後、それぞれの遺伝子配列に合わせてデザインされたPCRプライマーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物をプラスミドベクターに組み込み大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中から目的の蛋白をコードするcDNAを有するクローンを選択する。上記の全RNAの抽出には、市販のTRIzol試薬 (GIBCO BRL社)、ISOGEN (ニッポンジーン社) 等の試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit (Amersham BioSciences社) などの市販キット、cDNAへの変換には、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning (GIBCO BRL社) などの市販のcDNAライブラリー作製キットがそれぞれ使用される。ヒトフィブリノゲン遺伝子を取得する場合は、市販のcDNAライブラリー、例えば、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BD Bioscience) が用いられる。PCR用プライマーは、DNA合成受託機関(例えばQIAGEN社)などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5'側にKOZAK配列 (Kozak M, J.Mol.Biol., 196, 947 (1987)) 及び適切な制限酵素切断部位の配列を付加することが望ましい。好ましくは、配列番号1から6、13、15に記載の合成DNAがプライマーとして用いられる。PCR反応は、市販のAdvantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience) を用い、添付のプロトコールに従って行えばよい。PCRにより得られたDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット (インビトロジェン社) 等を用いてクローニングした後、DNAシーケンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ社) により決定される。

【0026】

このようにして得られるフィブリノゲン遺伝子、好ましくは、配列番号7から9、14、16に記載の配列を有する遺伝子断片を用いて動物細胞に組み込むための発現ベクターが構築される。動物細胞を宿主とする発現ベクターには特段の制約はないが、プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリ β アクチンなど、最終的にアッセンブルしたフィブリノゲンが得られるのであれば如何なるものでも良い。好ましくは、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGG (特開平3-168087) が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカージ遺伝子として、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカージ遺伝子 (Kriegler M著、加藤郁之進 監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994)) が利用できる。

【0027】

以上述べた要素を組み合わせる構築される発現ベクターの好ましい例として、 γ 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターと γ 鎖及び α 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターが挙げられる。より好ましくは、図1に示すpCAGGD-GB (フィブリノゲン γ 鎖と β 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカージとしてdhfr遺伝子を持つ) とpCAGGDN5-GA (フィブリノゲン γ 鎖と α 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカージとしてdhfr遺伝子及びneo遺伝子を持つ) が挙げられる。この2種類の発現ベクターは、 α 鎖及び β 鎖遺伝子に対する γ 鎖遺伝子の構成比が等量となるように等量混合され、動物細胞に導入される。しかしながら、本願発明はこの例に限定されるものではない。本願発明の最も重要な点は、最終的に宿主細胞に導入されたフィブリノゲンを構成する3種のポリペプチド、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする各遺伝子の宿主細胞内での構成比が、 α 鎖(及び/もしくは α 鎖の異型)遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖(及び/もしくは γ 鎖の異型)遺伝子の数を等量以上になるように組み込むことである。ここで、本願発明において「組み込む」とは、遺伝子を細胞に導入する工程のみならず導入された遺伝子を何らかの方法で遺伝子増幅する工程、最終的に遺伝子が宿主細胞ゲノムにイン

テグレートされた状態を包含することとする。遺伝子の構成比は、遺伝子を導入する工程やゲノム中に導入された遺伝子を増幅させる工程において調節することが可能である。例えば、dhfr遺伝子を用いてメトトレキセートなどの薬剤を用いて遺伝子増幅を行えば、目的遺伝子の数をゲノム中で数コピーから2000コピーまで増やすことが可能である (Iman AMら J Biol Chem., 262, 7368, 1987; Lau YFら Mol Cell Biol., 4, 1469, 1984; Crouse GFら Mol Cell Biol., 3, 257, 1983)。このことは、 γ 鎖遺伝子選択的にdhfr遺伝子を付加して宿主細胞ゲノムに導入し、メトトレキセートなどの薬剤を用いて遺伝子増幅を行えば、 γ 鎖遺伝子特異的に数コピーから2000コピーまで遺伝子数を増やすことが可能であることを示しており、技術的に、 α 鎖 β 鎖遺伝子の総数に対してそのような等倍から1000倍の構成比にすることが可能であることを示している。従って、組み込まれる遺伝子の構成比は、 α 鎖（及び/もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び/もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数を等量～1000倍ぐらいまで調節可能である。

【0028】

また、遺伝子を導入する工程においても、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を用いて動物細胞を形質転換する際に、その導入遺伝子の構成比において γ 鎖が少なくとも他の2つ α 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子に比べ等量から1000倍量になるように調整して形質転換を行えば良い。中でも最も好ましい比率として等量から3倍量があげられる。これらの要件を満たす方法なら、上記のように各鎖をコードする遺伝子が一つの発現ベクターに存在する必要はなく、例えば、前述したように α 鎖と β 鎖を1個ずつ有する発現ベクターと γ 鎖を2個有する発現ベクターとを等量混合して、構成比を1:1:2にし、これを動物細胞に導入することもできる。あるいは、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖が単独で発現するように構築した発現ベクターを、それぞれ1:1:2～6の割合で混合したもので動物細胞を形質転換することもできる。若しくは、一つの発現ベクター内に α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の各遺伝子の構成比が1:1:2～6となるように構築された発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換しても良い。さらには、前述の1:1:2～6の比率に加え、1:2:3～9、1:3:4～12、2:3:5～15（あるいは2:1:3～9、3:1:4～12、3:2:5～15）など、 α 鎖（及び/もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び/もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から3倍量となるような比率であれば、本願発明の要件を満たす。また、全ての遺伝子を同時に動物細胞内に導入するのではなく、別々の時期に選択マーカーを変えて動物細胞に順次導入し、最終的に細胞内に導入される α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の各遺伝子の構成比が前述の比（等倍から1000倍）になるようにしてもよい。また、先述のように導入工程時には上記比率でなくとも、 γ 鎖遺伝子を有する発現ベクターにdhfrやGS遺伝子など遺伝子増幅を可能にする選択マーカーを付加し、細胞内で上記比率（等倍から1000倍）になるように遺伝子増幅を行っても構わない。

【0029】

産生量増強因子としてはタンパク質生合成活性を増加させる作用及び/又はカススペースを阻害する作用を持つ因子が使用できるが、その代表例としてバキュロウイルス (AcNPV あるいはBmNPV) のP35遺伝子があげられる。例えば、バキュロウイルス (AcNPV) P35遺伝子は、文献 (Friesen, P.D. and Miller, L.K., J. Virol. 61, 2264-2272 (1987)) に報告されている配列を元にPCR用プライマーをデザインし、バキュロウイルス感染細胞やウイルスゲノムそのものを鋳型にしてPCRを行うことにより取得できる。好ましくは、配列番号10、11に記載の合成DNAがプライマーとして用いられる。PCR反応は、市販のAdvantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience) を用い、添付のプロトコールに従って行えばよい。PCRにより得られたDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット (インビトロジェン社) 等を用いてクローニングした後、DNAシーケンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ社) により決定される。このようにして得られるP35遺伝子、好ましくは、配列番号12記載の配列を有する遺伝子断片を用いて動物細胞に組み込む為の発現ベクターが構築される。その好ましい例として図3に示すベクターがあげられる。こ

れらは動物細胞に導入されるが、しかしながら、本願発明はこれらの例に限定されるものではない。バキュロウイルスP35遺伝子に代表される産生量増強作用を持つ因子をコードする遺伝子とフィブリノゲンを構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種の遺伝子に代表される目的とする産生遺伝子が同一細胞内で同時に発現できる形であれば特段の制限はない。バキュロウイルスP35遺伝子をコードする遺伝子の発現ベクターと、フィブリノゲンを構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種の遺伝子の発現ベクターの導入時期や導入の順番にも特段の制限はない。例えば、宿主細胞に産生量増強作用をもつ因子をコードする遺伝子の発現ベクターとフィブリノゲン発現ベクターを同時に導入しても良いし、別々の時期に導入しても構わない。予め宿主細胞に産生量増強作用をもつ因子をコードする遺伝子の発現ベクターを導入して新たな宿主細胞とすれば、より一層汎用性が増す。ただし、産生量増強作用をもつ因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターとフィブリノゲン遺伝子を有する発現ベクターとを別々の時期に宿主細胞に導入させる場合には、それぞれの発現ベクターの持つ選択マーカー遺伝子に各々異なったものを使う必要がある。

【0030】

発現ベクターを導入する宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞やSP2/0等マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞、COS細胞など様々な動物細胞が利用可能であるが、発現ベクターに使用されるプロモーター、選択及び遺伝子増幅用マーカー遺伝子に合わせて適当な細胞を選択すれば良い。例えば、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドを用いて構築した発現ベクターには、BHK21細胞やCHO細胞DG44株などが使用される。

【0031】

宿主細胞を形質転換するときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい(Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))。

【0032】

形質転換細胞の選択・増殖には、一般に動物細胞を形質転換する時に行われる方法を使用すればよい。例えば、形質転換後の細胞は、CHO-S-SFMII培地(GIBCO-BRL)、IS CHO-V培地(アイエスジャパン)、YMM培地等無血清培地やMEMアルファ培地、RPMI培地、ダルベッコMEM培地(いずれもGIBCO-BRL)に5-10%程度のウシ胎児血清を添加した血清培地などの一般的に動物細胞培養に用いられる培地に、使用する選択マーカーに合わせてメトトレキサート、G418、ピューロマイシン等を添加した選択培地を用いて、適宜培地交換をしながら、37℃前後で10~14日間程度培養される。この培養により、形質転換されていない細胞は死滅し、形質転換した細胞のみが増殖してくる。更に、形質転換細胞に対して、限界希釈法などの方法により、目的とするフィブリノゲン産生細胞株の選択及びクローン化が行われる。培養方法には、細胞の種類によってフィブリノゲンの検出・発現量の測定には、一般に蛋白質やポリペプチドの検出に用いられる方法、すなわち、ELISA, RIA, WB, SDS-PAGE等の方法を利用すれば良い。また、フィブリノゲンの活性であるクロッティングを直接測定しても良い。

【0033】

このようにして得られた本願発明の組換えフィブリノゲン産生細胞は、血清含有の培地中において細胞約 5×10^4 個/mlで播種し、4日間培養することによって培養液1 mlあたり~約100 μ gのフィブリノゲンを発現し、且つ無血清培地中においてもこのフィブリノゲン産生量を低下することなく増殖することができ、約 1.6×10^5 個/mlで播種し、約2週間のスピナー培養で培養液1mlあたり~約270 μ gの産生量(潜在的な産生量として~1520 μ g/ml)を達成できる有用な細胞である。また、さらに従来技術によるフィブリノゲンの産生量は最大約15 μ g/mlであったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合スピナー培養レベルで約42倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約704~3952 μ g/mlの潜在的な産生量をもつと推定される。

従来のアポトーシス抑制活性による産生増強効果は、栄養状態の悪くなる培養後期、酪酸などのように細胞毒性を示す濃度域で発現増強活性を示すような薬剤や細胞毒性を示すような何らかの因子との混合培養などタンパク質産生細胞にアポトーシスを誘導する条件下での培養に置いて最も良く効果を示すと考えられてきた。本願発明は、このような特殊条件下でなく、一般的な培養条件下、すなわち通常の生存率が低下しない時期での培養にも効果を発揮する。この点が、これまでのアポトーシス抑制因子による産生量増強とは明確に異なる。本願発明は、フェドバッチ培養、パフュージョン培養など育種方法との併用も可能であるので組換え細胞のフィブリノゲン産生能をさらに増強することができる。ゆえに本発明は、従来では、動物細胞では生産が難しく、産業化が難しかったフィブリノゲン生産の事業化ならびに、すでに事業化されているフィブリノゲン生産においても更なる産生量増強による大幅なコストダウンを可能にするものである。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社、アマシヤムファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

【実施例1】

【0034】

(フィブリノゲン遺伝子の単離)

ヒトフィブリノゲン遺伝子は、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BD Bioscience)をテンプレートとし、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖用にそれぞれ2本ずつ作製し(配列番号1~6)、Advantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience)を用いてキットのプロトコールに従ってPCR反応を行った。この結果、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖それぞれにPCR増幅のバンドが検出された。そのサイズは既知の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖cDNA遺伝子のサイズと一致していたため、これらの遺伝子をTAクローニングキット(インビトロジェン)を用いてクローニング(各々pFbgA、pFbgB、pFbgG)し、その塩基配列の決定をABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ)を用いて行った。その結果、配列番号7~9にそれぞれ示すFbgA、FbgB、FbgG遺伝子が得られた。

【実施例2】

【0035】

(フィブリノゲン遺伝子発現ベクターの構築)

本実施例に用いたフィブリノゲン β 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGD-GBならびに、フィブリノゲン α 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGDN5-GAは以下のようにして構築した。pCAGGD-GBについては、まず、pCAGG-S1 dhfr (WO 03/004641)をBamHIにて消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 dhfrNを構築し、これのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGGD-Gを構築した。さらに、pCAGG(Xho) (WO 03/004641)をSalIで消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG(Xho) Nを構築し、このプラスミドのXbaI-BamHIサイトに、pCAGG-S1 (WO 03/004641)のSalIを含むXbaI-BamHI断片を組み込み、得られたプラスミドのBamHIサイトを消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 2Nを構築した。このpCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgB由来のFbgB遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGG-Bを構築した。pCAGGD-GのNotIサイトにpCAGG-BのFbgB遺伝子を含むNotI断片を組み込み、最終的なフィブリノゲン β 鎖と γ 鎖の発現ベクターpCAGGD-GB(図1)を構築した。

【0036】

一方、pCAGGDN5-GAについては、最初にpCAGG-S1 dhfr neo (WO 03/004641)を不完全なBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、そのまま自己ligationすることにより2つあるBamHIサイトのうちneo遺伝子の3'側にあるBamHIサイトを欠失させ、さらにBamHIで消化して、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 dhfr neoN (pCAGGDN5-NotI)を構築

した。このpCAGG-S1 dhfr neoNのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したプラスミドのNotIサイトに、pCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgA由来のFbgA遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したpCAGG-AのFbgA遺伝子を含むNotI断片を組み込み、pCAGGDN5-GA (図1) を構築した。

【実施例3】

【0037】

(組換えフィブリノゲン発現細胞の作製：発現ベクターの細胞への導入、遺伝子増幅、クローニング)

実施例2で構築したフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを用いて以下に述べる方法にて、CHO DG44 (Urlaub Gら, Somatic cell. Mol. Genet., 12, 555 (1986)、以下CHO) 細胞を形質転換した。形質転換の前日にCHO細胞を6 well プレートに $1-0.5 \times 10^5$ cells/2 ml/wellの細胞密度で10%ウシ胎児血清 (FCS、GIBCO-BRL社製) を含むYMM培地 (インシュリン・トランスフェリン・エタノールアミン・亜セレン酸ナトリウムを含むアミノ酸・ビタミンを強化した核酸不含MEMアルファ培地) を用い播種した。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養の後、リボソーム系形質転換試薬、TransIT-LT1 (宝) あるいはリポフェクトアミン2000 (インビトロジェン) を用いて、あらかじめフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを各々等量混合し、PvuIで消化・線状化しておいたものを導入DNAとして、それぞれのプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養した後、選択培地、10%透析FCS (d-FCS：GIBCO-BRL社製)、0.5 mg/ml Geneticin (G418：GIBCO-BRL社製)、100nM メトトレキサート (MTX：和光純薬工業製) を含むYMM培地、あるいは10% d-FCS、0.5 mg/ml G418を含むYMM培地に培地交換した。3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

【0038】

得られた形質転換細胞のフィブリノゲン産生をELISAにて測定した。ELISAは以下に示す手順にて実施した。PBS (137mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄-12H₂O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄) で10 µg/mlに調製した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体 (Dako Cytomation) 100 µlをイムノモジュールプレート (ヌンク C8-445101) にアプライし、4℃に一晚置くことで固相化を行った。固相化したプレートの抗体溶液を除き、PBS 390 µlにて3回洗浄した。続いて、PBSで4倍に希釈したブロックエース (大日本製薬) を370 µlアプライし、室温で30分から2時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロッキング液を除き、サンプル (培養上清) およびスタンダードを100 µlアプライした。サンプル (フィブリノゲン産生細胞の培養上清) は、PBSで10倍に希釈したブロックエースを用いて100～800倍に希釈した。スタンダードには、Bolheal (化血研製：血漿由来のフィブリノゲンを含むバイアル1を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を80mg/mlとして計算し、PBSで1mg/mlに希釈した。) をサンプルと同じ希釈液にて100ng/ml～1ng/mlに希釈したものをを用いた。サンプルおよびスタンダードは、プレートにアプライ後、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% Tween-20/PBS) 390 µlにて4回洗浄を行い、続いて、サンプル希釈に用いた溶液 (PBSで10倍に希釈したブロックエース) で8000倍に希釈した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体・パーオキシダーゼ標識を100 µlアプライし、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% Tween-20/PBS) 390 µlにて4回洗浄を行った。発色は、TMB Substrate Kit (Kirkegaard&Perry Laboratories, Inc.) 100 µlをアプライし、暗所で30分静置後、1規定硫酸 100 µlで反応を停止した。反応停止後30分以内に、プレートリーダー (モレキュラーデバイス) にて、450nm-650nmの吸光度を測定し、検量線からフィブリノゲン濃度を求めた。

【0039】

このELISAにてフィブリノゲン産生能の高い形質転換細胞を選び出し、次にMTX遺伝子増幅を行った。10% d-FCS、0.5 mg/ml G418を含み、段階的にMTX濃度を上げたYMM培地に細胞を懸濁し、24 well プレートに 5×10^4 cells / 0.5ml / wellにて播種し、3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、高濃度のMTX

に耐性の形質転換体を得た。表 1 にその代表的な結果を示す（表中「*」：細胞がコンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量）。

【0040】

【表 1】

細胞名	MTX 濃度 (μ M)	産生量 (μ g/ml)*
CH002-24	0.1	24.4
CH003-1A4	3	20.9
CH004-2A4	0.5	32
CH004-2A5	0.5	36
CH004-13A7B2	3	28
CH006-3A1	4	45.3
CH006-13	24	34
CH006-19A1	4	33

【0041】

このような組換えフィブリノゲン産生細胞のクローニングを行った。10% d-FCS、0.5 mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに1個/wellの濃度で200 μ l/wellずつ播種することで限界希釈によるクローニングを行った。得られたクローンについて、コンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量を調べたところ、 $\sim 56.8 \mu$ g/mlに達するクローンが得られた。その中の一つのクローンCH002-24-4を10% d-FCS、0.5mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、6 wellプレートに 2×10^5 cells/2 ml/wellで播種し、4日間の培養を行い、培養上清中のフィブリノゲンの量をELISA法にて測定したところ、103.3 μ g/mlに達しており、組換え動物細胞によるフィブリノゲンの産生量として100 μ g/mlのオーダーを初めて超えたことを示した。

【実施例 4】

【0042】

（産生されたフィブリノゲンのウエスタンブロット解析）

産生されたフィブリノゲンのウエスタンブロットを行った。フィブリノゲン・サンプルとして、CH001-1-2細胞を 2×10^5 cells/mlの密度で10% d-FCSを含むYMM培地を用い播種し、一夜培養し、翌日培地を、FCSを含まないYMM培地に交換し、37℃、5% CO₂培養装置で4日間培養後、その培養上清中に存在するフィブリノゲンを解析に用いた。

サンプルを5xSDS処理バッファー（0.3125M Tris, 5% SDS, 25% グリセロール, 0.05% プロモフェノールブルー, 5% 2-メルカプトエタノール pH6.8）と1:4で混合し、100℃、5分間ボイルした。これらのサンプルをゲルとしてパジェル5-20%（ATTO）を使用し、泳動条件として40mA 定電流、1.5時間で電気泳動を行った。泳動後、ゲルとImmobilon Transfer Membranes（以下Membrane: MILLIPORE）を密着させ、ホライズブロット（ATTO）を用いて100mA 定電流、25分間でMembraneに泳動タンパク質をトランスファーした。Membraneはブロックエース（大日本製薬）原液で1時間室温にてブロッキングし、次に抗ヒトフィブリノーゲン・ウサギポリクローナル抗体（Dako Cytomation）0.55 μ g/mlを含む10% ブロックエース, 0.05% Tween-20/TBS (50mM Tris, 150mM NaCl pH7.5) に浸し、37℃、30分間振盪した。さらに0.05% Tween-20/TBSで5分振盪を3回繰り返して洗浄した後、さらにTBSで3回洗浄し、ブロックエース（大日本製薬）原液で5分間室温にてブロッキングした。続いて、10% ブロックエース, 0.05% Tween-20/TBS にて3000倍に希釈されたGoat Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase Conjugate (BIOSOURCE) 溶液に浸し、37℃、30分間振盪した。0.05% Tween-20/TBSで5分振盪を3回繰り返して洗浄した後、さらにTBSで3回洗浄し、Phosphatase Substrate(KPL)で発色させた。

その結果を図2に示す。還元下において、CH001-1-2 培養上清中に産生されたフィブリノゲンは血漿由来のフィブリノゲンを含むボルヒールと同じサイズの蛋白があることが確認された。また、これら3本のバンドは既知のフィブリノゲン各鎖の分子量と一致してい

た (α 鎖; 66kDa、 β 鎖; 52kDa、 γ 鎖; 46.5kDa)。

【実施例 5】

【0043】

(組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養)

組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養時の産生能を調べた。実施例 3 において 10^6 μ g/ml 以上の産生量を示したクローン CHO02-24-4 を、PBS にて 2 回洗浄後、表 2 に示す培地 (CHO-S-SFMII、IS CHO-V は無血清培地、10%d-FCS/YMM は血清培地) にそれぞれ懸濁し、 10^5 cells/ml で 2 ml/well of 6well プレートで播種し、4 日間培養を行い、得られた細胞数のカウントと培養上清中のフィブリノゲン産生量を前述の ELISA にて測定した。その結果、表 2 に示すように、 1×10^4 cells 当たりのフィブリノゲン産生能は、血清培地 (10%d-FCS を含む YMM 培地) を用いた場合より高く、無血清培地でも血清培地と同等以上の産生能力があることが示された。このことは、一般的な高密度培養の場合 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml は達成可能であるので、培養条件さえ良ければ、単純計算で約 440 ~ 1520 μ g/ml 以上のフィブリノゲンを産生させる潜在能力があることを示している。

【0044】

【表 2】

培地	メーカー	産生量 (μ g/ 1×10^4 cells)
10%d-FCS/YMM	自家調製	2.0
CHO-S-SFMII	GIBCO	4.4
IS CHO-V	アイエスジャパン	7.6

【0045】

さらに、この CHO-S-SFMII 培地で増殖した CHO02-24-4 細胞を、同じく CHO-S-SFMII を基本とした無血清培地 100ml に 1.6×10^5 cells/ml で播種し、techne 社製のスピナーフラスコを用いた約 2 週間の浮遊培養 (回転数 45rpm) で 272.7 μ g/ml という、産生量を達成した。また、別クローン CHO04-2A4-3 細胞を同じく、CHO-S-SFMII を基本とした無血清培地 100ml に 8×10^4 cells/ml で播種し、techne 社製のスピナーフラスコを用いた約 2 週間の浮遊培養 (回転数 45rpm) で 98.2 μ g/ml を達成している。このように、本願発明の方法により確立した細胞が、フィブリノゲン産生に関して無血清培地で ~ 約 270 μ g/ml の産生量を達成し、これまでにない高産生細胞であることが示された。

【実施例 6】

【0046】

(P35 遺伝子のクローニングと発現ベクター構築)

バキュロウイルス AcNPV (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Invitrogen より購入) 由来のウイルス液 (2×10^7 pf/ml) からプロテナーゼ K 処理、フェノール抽出によりウイルスゲノムを調製し、これを鋳型として、プライマーとして Kozak 配列および必要な酵素 site を加えたものを 5' 用、3' 用の 2 本作製し (配列番号 10、11)、Advantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience) を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物のサイズは既知の P35 遺伝子のサイズと一致していたため、これを TA クローニング (Invitrogen) した。得られたプラスミドについて、その塩基配列の決定を ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて行った結果、文献 (Friesen PD, Miller LK., J Virol. 61(7): 2264-72. 1987) の配列と同じ配列を持った P35 遺伝子クローン (配列番号 12) が得られた。

【0047】

すでにフィブリノゲンを発現している細胞に P35 遺伝子を導入するために、まず選択マーカーとして puromycin 耐性遺伝子をもったベクターを構築した。23 番目のセリンをアルギニンに変換した変異 DHFR を持った発現プラスミド pCAGG-S1 mdhfr (WO 03/004641) の SapI、NotI サイト間に BamHI サイトを挿入するために、GGC CGC GGA TCC GCT CTT CC 及び AGC GGA AGA GCG GAT CCG C の 2 つのリンカーを合成し、リンカーライゲーションを行い、pC

AGGM5を構築した。さらに、pCAGGM5のBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、XhoIリンカー（宝）を用いたリンカーライゲーションさせることによりXhoIを導入した。このプラスミドのXhoIサイトにpPGKPuro (Watanabe, S., Kai, N., Yasuda, M., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. (1995).) のpuromycin耐性遺伝子を含むSalI断片を挿入してpCAGGMP5-NotIを構築した。次にこのプラスミドから変異DHFR (mdhfr) 遺伝子を含むSalI-NotI断片を除き、代わりにpCAGGDN5-NotIのDHFR遺伝子を含むSalI-NotI断片を挿入してpCAGGDP5-NotIを構築した。pCAGGDP5-NotIのSalIサイトにPCRクローニングしたP35遺伝子のXhoI断片を挿入し、目的のpCAGGDP5-P35（図3）を構築した。

【実施例7】

【0048】

（P35遺伝子形質転換細胞）

実施例6で構築したP35発現プラスミドpCAGGDP5-P35を用いて以下に述べる方法にて、実施例3で得られた組換えフィブリノゲン産生クローン、CH002-24-4細胞を形質転換した。CH002-24-4細胞を12wellプレートに $1-0.5 \times 10^5$ cells/ml/wellの細胞密度でCHO-S-SFMI I培地（GIBCO-BRL）を用い播種した。リボソーム系形質転換試薬であるリポフェクトアミン2000（インビトロジェン）を用いて、あらかじめP35発現プラスミドpCAGGDP5-P35をPvu Iで消化・線状化しておいたものを導入DNAとして、リポフェクトアミン2000のプロトコルに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養した後、選択培地として4μg/ml puromycin (BD Bioscience) を含むCHO-S-SFMI I培地に交換した。3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

【0049】

導入したP35遺伝子の効果を調べるために、得られたP35遺伝子形質転換体の一つであるP9GD細胞とその親株である2-24-4細胞をCHO-S-SFMI I培地100mlに約 1.0×10^5 cells/mlで播種し、techne社製のスピナーフラスコを用いた約2週間の浮遊培養（回転数45rpm）を行い、増殖曲線、生存率、フィブリノゲン産生量を調べた。その結果、図4に示すように、最大細胞密度でP9GD細胞が 2.2×10^6 cells/ml、2-24-4細胞が 7.2×10^5 cells/mlと約3倍に増加していた。また、P9GD細胞が50%生存率に達するのが2-24-4細胞に比べ3日遅くなった。結果として、培養15日目の産生量は、P9GD細胞が365.2μg/mlに対し2-24-4細胞は162.7μg/mlとなり約2.2倍に増加した。さらに、CHO-S-SFMI I培地を基本とし栄養成分を強化した改良型無血清培地を用いて同様にスピナー培養を行ったところ、図5に示すように生存率ではほとんど差が無かったが、最大細胞密度ではP9GD細胞の 2.5×10^6 cells/mlに対し、2-24-4細胞が 9.4×10^5 cells/mlと約2.6倍に増加していた。さらに、培養15日での産生量については、P9GD細胞が463.7μg/mlに対し2-24-4細胞は295.6μg/mlとなり約1.6倍に増加した。

【0050】

P9GD細胞のクローニングを行った。CHO-S-SFMI I培地を基本とした改良型無血清培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに50個/200μl/wellずつ播種することでクローニングを行った。得られたクローンP9GD-10Cについて、P9GD細胞と同様にCHO-S-SFMI I培地を基本とし栄養成分を強化した改良型無血清培地を用いて同様にスピナー培養を行ったところ、生存率、到達生細胞密度には差が無く、培養13日での産生量が631.5μg/mlとなり、2-24-4細胞の239.8μg/mlに対して約2.6倍に増加した（図6）。生存率、生細胞数に差がないことからP35の抗アポトーシス作用ではなく、P35のもつタンパク質生合成活性増強作用によって産生量が増大したと考えられた。

課題を解決するための手段の項で述べたように本発明以前に知られていたフィブリノゲンの最大産生量は約15μg/mlであったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合、スピナー培養レベルで631.5μg/mlとなり、約42倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子導入の親株となった2-24-4細胞の潜在的なフィブリノゲン産生能力が440～1520μg/ml以上と推定されているので、P35遺伝子が導入された場合には約1.6～2.6倍の効果

があることから、単純計算で約704~3952 μ g/mlの潜在的な産生量をもつと推定される。このように、本願発明の方法により確立された細胞がこれまでにないフィブリノゲンを高産生する細胞であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0051】

本願発明により得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞は、フィブリノゲンを高産生するので、モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製する際の抗原として、あるいは、抗ヒトフィブリノゲン抗体とフィブリノゲンとの結合に関する研究材料として利用できる。更に、本願発明で得られるフィブリノゲンは、血液由来のフィブリノゲンと異なり、フィブリノゲン以外の血液凝固や線溶関連の因子を含まない純粋なフィブリノゲンとして調製可能である。従って、血液凝固・線溶に関連した研究の研究材料としても有用である。また、フィブリノゲンを抗原として単独で又は種々の安定剤、保護剤、防腐剤等の添加物と共に用いることにより、各種疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療剤等医薬品の提供を可能ならしめるものである。例えば、DICのような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。

【0052】

また、本願発明の組換えヒトフィブリノゲンは、フィブリンの膠着性を利用して組織接着剤として、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアリークの閉鎖など広範にわたる治療、あるいは組織再生を目的とした再生医療の基剤に対する好適な薬として利用される。

このように、本願発明の方法により得られる組換えフィブリノゲン産生細胞及び当該細胞により得られる組換えヒトフィブリノゲンは、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】組換えフィブリノゲン産生細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

【図2】産生されたフィブリノゲンのウエスタンブロットプロファイルの結果を示した図面である。レーン1：Marker (Amersham Rainbow Marker 756)、レーン2：Boehringer (化血研製：血漿由来のフィブリノゲンを含むバイアル1を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を80mg/mlとして計算し、PBSで希釈した。1 μ g/lane)、レーン3：CH001-1-2 培養上清 (8 μ l/lane)、レーン4：CH001-1-2 培養上清 (24 μ l/lane)

【図3】バキュロウイルスP35遺伝子発現細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

【図4】バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

【図5】バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

【図6】バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH =
INSTITUTE

<120> A method for the production of high expression recombinant =
fibrinogen producing cells

<130> 2003TE0717

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

ccccaagctt gtcgacgcca ccatgttttc catgaggatc gtctg 45

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ccatcgatgg atccgtcgac ttactagggg gacaggggaag gcttccccaaggaggagaagtg 60

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ccccaagctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattattg ctactattgt gtgtttttct 60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

cggaattctg atcagtcgac ttactattgc tgtgggaaga agggcctgat cttcatactc 60

<210> 5
<211> 56
<212> DNA
<213> Human

<400> 5
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgagttg gtccttgac ccccggaatt taattc 56

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> Human

<400> 6
cggaattcgg atccgtcgac ttattaaacg tctccagcct gtttggtcc c 51

<210> 7
<211> 1980
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgttttc catgaggatc gtcgcctgg tcctaagtgt 60
ggtgggcaca gcatggactg cagatagtgg tgaaggtagac tttctagctg aaggaggagg 120
cgtgcgtggc ccaagggttg tggaaagaca tcaatctgcc tgcaaagatt cagactggcc 180
cttctgctct gatgaagact ggaactacaa atgcccttct ggctgcagga tgaaagggtt 240
gattgatgaa gtcaatcaag attttacaaa cagaataaat aagctcaaaa attcactatt 300
tgaatatcag aagaacaata aggattctca ttcgttgacc actaatataa tggaaatttt 360
gagaggcgat ttttctcag ccaataaccg tgataatacc tacaaccgag tgcagagga 420
tctgagaagc agaattgaag tcctgaagcg caaagtcata gaaaaagtac agcatatcca 480
gcttctgcag aaaaatgta gagctcagtt gggtgatatg aaacgactgg aggtggacat 540
tgatattaag atccgatctt gtcgagggtc atgcagtagg gctttagctc gtgaagtaga 600
tctgaaggac tatgaagatc agcagaagca acttgaacag gtcattgcc aagacttact 660
tccctctaga gataggcaac acttaccact gataaaaatg aaaccagttc cagacttggt 720
tcccggaaat ttttaagagcc agcttcagaa ggtaccccca gagtggaagg cattaacaga 780

catgccgcag atgagaatgg agttagagag acctgggtgga aatgagatta ctgaggagg 840
ctccacctct tatggaaccg gatcagagac ggaaagcccc aggaacccta gcagtgtctg 900
aagctggaac tctgggagct ctggacctgg aagtactgga aaccgaaacc ctgggagctc 960
tgggactgga gggactgcaa cctggaaacc tgggagctct ggacctggaa gtactggaag 1020
ctggaactct gggagctctg gaactggaag tactggaaac caaaacctg ggagccctag 1080
acctggtagt accggaacct ggaatcctgg cagctctgaa cgcggaagtg ctgggcactg 1140
gacctctgag agctctgtat ctggtagtac tggacaatgg cactctgaat ctggaagttt 1200
taggccagat agcccaggct ctgggaacgc gaggcctaac aaccagact ggggcacatt 1260
tgaagaggtg tcaggaaatg taagtccagg gacaaggaga gattaccaca cagaaaaact 1320
ggtcacttct aaaggagata aagagctcag gactggtaaa gagaaggta cctctggtag 1380
cacaaccacc acgcgtcgtt catgctctaa aaccgttact aagactgtta ttggtcctga 1440
tggtcacaaa gaagttacca aagaagtggg gacctccgaa gatggttctg actgtcccga 1500
ggcaatggat ttaggcacat tgtctggcat aggtactctg gatgggttcc gccataggca 1560
ccctgatgaa gctgccttct tcgacactgc ctcaactgga aaaacattcc caggtttctt 1620
ctcacctatg ttaggagagt ttgtcagtga gactgagtct aggggctcag aatctggcat 1680
cttcacaaat acaaaggaat ccagttctca tcaccctggg atagctgaat tcccttcccg 1740
tggtaaatct tcaagttaca gcaacaatt tactagtagc acgagttaca acagaggaga 1800
ctccacattt gaaagcaaga gctataaaat ggcagatgag gccggaagtg aagccgatca 1860
tgaaggaaca catagcacca agagaggcca tgctaaatct cgccctgtca gaggtatcca 1920
catttctcct ttggggaagc cttccctgtc ccctagtaa gtcgacggat ccatcgatgg 1980

<210> 8
<211> 1479
<212> DNA
<213> Human

<400> 8
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattattg ctactattgt gtgttttct 60

agttaagtcc caaggtgtca acgacaatga ggagggtttc ttcagtgcc gttggtcatcg 120
 accccttgac aagaagagag aagaggctcc cagcctgagg cctgccccac cgccccatcag 180
 tggaggtggc tatcgggctc gtccagccaa agcagctgcc actcaaaaga aagtagaaa 240
 aaaagcccct gatgctggag gctgtcttca cgctgaccca gacctggggg tgttgtgtcc 300
 tacaggatgt cagttgcaag aggctttgct acaacaggaa aggccaatca gaaatagtgt 360
 tgatgagtta aataacaatg tggaagctgt ttcccagacc tcctcttctt cctttcagta 420
 catgtatttg ctgaaagacc tgtggcaaaa gaggcagaag caagtaaaag ataatgaaaa 480
 tgtagtcaat gagtactcct cagaactgga aaagcaccaa ttatatatag atgagactgt 540
 gaatagcaat atcccaacta accttcgtgt gcttcgttca atcctggaaa acctgagaag 600
 caaaatacaa aagttagaat ctgatgtctc agctcaaag gaatattgtc gcaccccatg 660
 cactgtcagt tgcaatattc ctgtgggtgtc tggcaaagaa tgtgaggaaa ttatcaggaa 720
 aggaggtgaa acatctgaaa tgtatctcat tcaacctgac agttctgtca aaccgtatag 780
 agtatactgt gacatgaata cagaaaatgg aggatggaca gtgattcaga accgtcaaga 840
 cggtagtgtt gactttggca ggaaatggga tccatataaa cagggtattg gaaatgttgc 900
 aaccaacaca gatgggaaga attactgtgg cctaccaggt gaatattggc ttggaaatga 960
 taaaattagc cagcttacca ggatgggacc cacagaactt ttgatagaaa tggaggactg 1020
 gaaaggagac aaagtaaagg ctactatgg aggattcact gtacagaatg aagccaacaa 1080
 ataccagatc tcagtgaaca aatacagagg aacagccggt aatgccctca tggatggagc 1140
 atctcagctg atgggagaaa acaggaccat gaccattcac aacggcatgt tcttcagcac 1200
 gtatgacaga gacaatgacg gctgggttaac atcagatccc agaaaacagt gtictaaaga 1260
 agacggtggt ggatggtggt ataatagatg tcatgcagcc aatccaaacg gcagatacta 1320
 ctggggtgga cagtacacct gggacatggc aaagcatggc acagatgatg gtgtagtatg 1380
 gatgaattgg aaggggtcat ggtactcaat gaggaagatg agtatgaaga tcaggccctt 1440
 cttccacag caatagtaag tcgactgatc agaattccg 1479

<211> 1359
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 9
 cccaagctt gtcgacgcca ccatgagttg gtccttgac ccccggaatt taattcfcta 60
 cttctatgct cttttatttc tctcttcaac atgtgtagca tatgttgcta ccagagacaa 120
 ctgctgcac ttagatgaaa gattcggtag ttattgtcca actacctgtg gcattgcaga 180
 tttcctgtct acttatcaaa ccaaagtaga caaggatcta cagtctttgg aagacatctt 240
 acatcaagtt gaaaacaaaa catcagaagt caaacagctg ataaaagcaa tccaactcac 300
 ttataatcct gatgaatcat caaaacaaa tatgatagac gctgctactt tgaagtccag 360
 gaaaatgtta gaagaaatta tgaaatatga agcatcgatt ttaacacatg actcaagtat 420
 tcgatatttg caggaaatat ataattcaaa taatcaaaag attgttaacc tgaaagagaa 480
 ggtagcccag cttgaagcac agtgccagga accttgcaaa gacacggtgc aaatccatga 540
 tatcactggg aaagattgtc aagacattgc caataaggga gctaaacaga gcgggcttta 600
 ctttattaaa cctctgaaag ctaaccagca attcttagtc tactgtgaaa tcgatgggtc 660
 tggaaatgga tggactgtgt ttcagaagag acttgatggc agtgtagatt tcaagaaaaa 720
 ctggattcaa tataaagaag gatttgaca tctgtctcct actggcaca cagaattttg 780
 gctgggaaat gagaagattc atttgataag cacacagtct gccatcccat atgcattaag 840
 agtggaaactg gaagactgga atggcagaac cagtactgca gactatgcca tgttcaaggt 900
 gggacctgaa gctgacaagt accgcctaac atatgcctac ttcgctggtg gggatgctgg 960
 agatgccttt gatggctttg attttggcga tgatcctagt gacaagtttt tcacatccca 1020
 taatggcatg cagttcagta cctgggacaa tgacaatgat aagtttgaag gcaactgtgc 1080
 tgaacaggat ggatctggtt ggtggatgaa caagtgtcac gctggccatc tcaatggagt 1140
 ttattaccaa ggtggcactt actcaaaagc atctactcct aatggttatg ataatggcat 1200
 tatttgggcc acttgaaaaa cccggtggta ttccatgaag aaaaccacta tgaagataat 1260
 ccattcaac agactcaca ttggagaagg acagcaacac cacctggggg gagccaaaca 1320
 ggctggagac gttaataag tcgacggatc cgaattccg 1359

<210> 10
<211> 60
<212> DNA
<213> Baculovirus

<400> 10
CCGCTCGAGG AATTCGCCAC CATGTGTGTA ATTTTCCGG TAGAAATCGA CGTGTCCCAG

<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> Baculovirus

<400> 11
CCGCTCGAGG AATTCTACTC GTAAAGCCAG TTCAATTTTA AAAACAAATG ACAT

<210> 12
<211> 1035
<212> DNA
<213> Baculovirus

<400> 12
CCGCTCGAGG AATTCGCCAC CATGTGTGTA ATTTTCCGG TAGAAATCGA CGTGTCCCAG 60
ACGATTATTC GAGATTGTCA GGTGGACAAA CAAACCAGAG AGTTGGTGTA CATTAACAAG 120
ATTATGAACA CGCAATTGAC AAAACCCGTT CTCATGATGT TTAACATTTC GGGTCCTATA 180
CGAAGCGTTA CGCGCAAGAA CAACAATTTG CGCGACAGAA TAAATCAAA AGTCGATGAA 240
CAATTTGATC AACTAGAACG CGATTACAGC GATCAAATGG ATGGATTCCA CGATAGCATC 300
AAGTATTTTA AAGATGAACA CTATTCGGTA AGTTGCCAAA ATGGCAGCGT GTTGAAAAGC 360
AAGTTTGCTA AAATTTTAAA GAGTCATGAT TATACCGATA AAAAGTCTAT TGAAGCTTAC 420
GAGAAATACT GTTTGCCCAA ATTGGTCGAC GAACGCAACG ACTACTACGT GGCGGTATGC 480
GTGTTGAAGC CGGGATTTGA GAACGGCAGC AACCAAGTGC TATCTTTCGA GTACAACCCG 540
ATTGGTAACA AAGTTATTGT GCCGTTTGCT CACGAAATTA ACGACACGGG ACTTTACGAG 600
TACGACGTCG TAGCTTACGT GGACAGTGTG CAGTTTGATG GCGAACAATT TGAAGAGTTT 660
GTGCAGAGTT TAATATTGCC GTCGTCGTTT AAAAATTCGG AAAAGGTTTT ATATTACAAC 720
GAAGCGTCGA AAAACAAAAG CATGATCTAC AAGGCTTTAG AGTTTACTAC AGAATCGAGC 780
TGGGGCAAAT CCGAAAAGTA TAATTGAAAA ATTTTTTGTA ACGGTTTTAT TTATGATAAA 840

AAATCAAAAG TGTGTATGT TAAATTGCAC AATGTAATA GTGCACTCAA CAAAAATGTA 900
 ATATTAAACA CAATTAAATA AATGTTAAAA TTTATTGCCT AATATTATTT TGTCATTGCT 960
 TGTCATTTAT TAATTTGGAT GATGTCATTT GTTTTTAAAA TTGAACTGGC TTTACGAGTA 1020
 GAATTCCTCG AGCGG 1035

<210> 13
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 13
 CCATCGATGG ATCCGTCGAC TTACTATTGG GTCACAAGGG GCCTAATTTT CATGCCAACA 60

GCCCTGAGGG AATATAG 77

<210> 14
 <211> 2646
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 14
 CCCCAGCTT GTCGACGCCA CCATGTTTTT CATGAGGATC GTCTGCCTGG TCCTAAGTGT 60
 GGTGGGCACA GCATGGAAGT CAGATAGTGG TGAAGGTGAC TTTCTAGCTG AAGGAGGAGG 120
 CGTGCGTGGC CCAAGGGTTG TGGAAAGACA TCAATCTGCC TGCAAAGATT CAGACTGGCC 180
 CTTCTGCTCT GATGAAGACT GGAAGTACAA ATGCCCTTCT GGCTGCAGGA TGAAAGGGTT 240
 GATTGATGAA GTCAATCAAG ATTTTACAAA CAGAATAAAT AAGCTCAAAA ATTCATATT 300
 TGAATATCAG AAGAACAATA AGGATTCTCA TTCGTTGACC ACTAATATAA TGGAATTTT 360
 GAGAGGCGAT TTTTCCTCAG CCAATAACCG TGATAATACC TACAACCGAG TGTCAGAGGA 420
 TCTGAGAAGC AGAATTGAAG TCCTGAAGCG CAAAGTCATA GAAAAAGTAC AGCATATCCA 480
 GCTTCTGCAG AAAAATGTTA GAGCTCAGTT GGTGATATG AAACGACTGG AGGTGGACAT 540
 TGATATTAAG ATCCGATCTT GTCGAGGGTC ATGCAGTAGG GCTTTAGCTC GTGAAGTAGA 600
 TCTGAAGGAC TATGAAGATC AGCAGAAGCA ACTTGAACAG GTCATTGCCA AAGACTTACT 660
 TCCCTCTAGA GATAGGCAAC ACTTACCACT GATAAAAATG AAACCAGTTC CAGACTTGGT 720

TCCCGGAAAT TTAAAGAGCC AGCTTCAGAA GGTACCCCCA GAGTGGAAGG CATTAACAGA 780
 CATGCCGCAG ATGAGAATGG AGTTAGAGAG ACCTGGTGG AATGAGATTA CTCGAGGAGG 840
 CTCCACCTCT TATGGAACCG GATCAGAGAC GGAAAGCCCC AGGAACCCTA GCAGTGCTGG 900
 AAGCTGGAAC TCTGGGAGCT CTGGACCTGG AAGTACTGGA AACC GAAACC CTGGGAGCTC 960
 TGGGACTGGA GGGACTGCAA CCTGGAAACC TGGGAGCTCT GGACCTGGAA GTACTGGAAG 1020
 CTGGA ACTCT GGGAGCTCTG GAACTGGAAG TACTGGAAC CAAAACCCTG GGAGCCCTAG 1080
 ACCTGGTAGT ACCGGAACCT GGAATCCTGG CAGCTCTGAA CGCGGAAGTG CTGGGCACTG 1140
 GACCTCTGAG AGCTCTGTAT CTGGTAGTAC TGGACAATGG CACTCTGAAT CTGGAAGTTT 1200
 TAGGCCAGAT AGCCCAGGCT CTGGGAACGC GAGGCCTAAC AACCCAGACT GGGGCACATT 1260
 TGAAGAGGTG TCAGGAAATG TAAGTCCAGG GACAAGGAGA GAGTACCACA CAGAAAAACT 1320
 GGTC ACTTCT AAAGGAGATA AAGAGCTCAG GACTGGTAAA GAGAAGGTCA CCTCTGGTAG 1380
 CACAACCACC ACGCGTCGTT CATGCTCTAA AACCGTTACT AAGACTGTTA TTGGTCCTGA 1440
 TGGTCACAAA GAAGTTACCA AAGAAGTGGT GACCTCCGAA GATGGTTCTG ACTGTCCCGA 1500
 GGCAATGGAT TTAGGCACAT TGTCTGGCAT AGGTACTCTG GATGGGTTCC GCCATAGGCA 1560
 CCCTGATGAA GCTGCCTTCT TCGACACTGC CTCAACTGGA AAAACATTCC CAGGTTTCTT 1620
 CTCACCTATG TTAGGAGAGT TTGTCAGTGA GACTGAGTCT AGGGGCTCAG AATCTGGCAT 1680
 CTTCACAAAT ACAAAGGAAT CCAGTTCTCA TCACCCTGGG ATAGCTGAAT TCCCTTCCCG 1740
 TGGTAAATCT TCAAGTTACA GCAAACAATT TACTAGTAGC ACGAGTTACA ACAGAGGAGA 1800
 CTCCACATTT GAAAGCAAGA GCTATAAAAT GGCAGATGAG GCCGGAAGTG AAGCCGATCA 1860
 TGAAGGAACA CATAGCACCA AGAGAGGCCA TGCTAAATCT CGCCCTGTCA GAGACTGTGA 1920
 TGATGTCCTC CAAACACATC CTTCAGGTAC CCAAAGTGGC ATTTTCAATA TCAAGCTACC 1980
 GGGATCCAGT AAGATTTTTT CTGTTTATTG CGATCAAGAG ACCAGTTTGG GAGGATGGCT 2040
 TTTGATCCAG CAAAGAATGG ATGGATCACT GAATTTTAAC CGGACCTGGC AAGACTACAA 2100
 GAGAGGTTTC GGCAGCCTGA ATGACGAGGG GGAAGGAGAA TTCTGGCTAG GCAATGACTA 2160
 CCTCCACTTA CTAACCCAAA GGGGCTCTGT TCTTAGGGTT GAATTAGAGG ACTGGGCTGG 2220

GAATGAAGCT TATGCAGAAT ATCACTTCCG GGTAGGCTCT GAGGCTGAAG GCTATGCCCT 2280
 CCAAGTCTCC TCCTATGAAG GCACTGCGGG TGATGCTCTG ATTGAGGGTT CCGTAGAGGA 2340
 AGGGGCAGAG TACACCTCTC ACAACAACAT GCAGTTCAGC ACCTTTGACA GGGATGCAGA 2400
 CCAGTGGGAA GAGAACTGTG CAGAAGTCTA TGGGGGAGGC TGGTGGTATA ATAACTGCCA 2460
 AGCAGCCAAT CTCAATGGAA TCTACTACCC TGGGGGCTCC TATGACCCAA GGAATAACAG 2520
 TCCTTATGAG ATTGAGAATG GAGTGGTCTG GGTTCCTTT AGAGGGGCAG ATTATTCCCT 2580
 CAGGGCTGTT CGCATGAAAA TTAGGCCCT TGTGACCCAA TAGTAAGTCG ACGGATCCAT 2640
 CGATGG 2646

<210> 15
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 15
 CGGAATTCGG ATCCGTCGAC TTACTACAAA TCATCCTCAG GGTAAAGTGA GTCATATTCT 60

GTTCCTGCAG GGTGCTC 77

<210> 16
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> Human

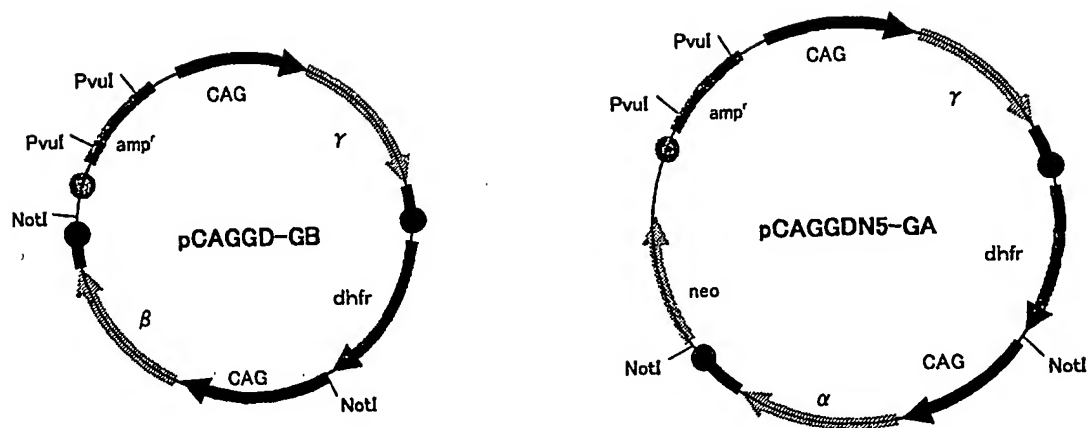
<400> 16

CCCCAAGCTT GTCGACGCCA CCATGAGTTG GTCCTTGAC CCCCAGAATT TAATTCTCTA 60
 CTTCTATGCT CTTTATTTT TCTCTTCAAC ATGTGTAGCA TATGTTGCTA CCAGAGACAA 120
 CTGCTGCATC TTAGATGAAA GATTCGGTAG TTATTGTCCA ACTACCTGTG GCATTGCAGA 180
 TTTCTGTCT ACTTATCAAA CCAAAGTAGA CAAGGATCTA CAGTCTTTGG AAGACATCTT 240
 ACATCAAGTT GAAAACAAAA CATCAGAAGT CAAACAGCTG ATAAAAGCAA TCCAACTCAC 300
 TTATAATCCT GATGAATCAT CAAAACAAA TATGATAGAC GCTGCTACTT TGAAGTCCAG 360
 GAaAATGTTA GAAGAAATTA TGAAATATGA AGCATCGATT TTAACACATG ACTCAAGTAT 420
 TCGATATTTG CAGGAAATAT ATAATTCAAA TAATCAAAAAG ATTGTAAACC TGAAAGAGAA 480
 GGTAGCCCAG CTTGAAGCAC AGTGCCAGGA ACCTTGCAAA GACACGGTGC AAATCCATGA 540

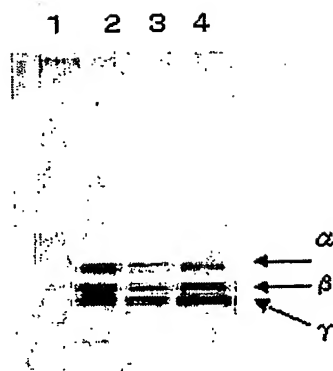
TATCACTGGG AAAGATTGTC AAGACATTGC CAATAAGGGA GCTAAACAGA GCGGGCTTTA 600
 CTTTATTAAA CCTCTGAAAG CTAACCAGCA ATTCTTAGTC TACTGTGAAA TCGATGGGTC 660
 TGAAATGGA TGGACTGTGT TTCAGAAGAG ACTTGATGGC AGTGTAGATT TCAAGAAAAA 720
 CTGGATTCAA TATAAAGAAG GATTTGGACA TCTGTCTCCT ACTGGCACAA CAGAATTTTG 780
 GCTGGGAAAT GAGAAGATTC ATTTGATAAG CACACAGTCT GCCATCCCAT ATGCATTAAG 840
 AGTGGAAGTG GAAGACTGGA ATGGCAGAAC CAGTACTGCA GACTATGCCA TGTTC AAGGT 900
 GGGACCTGAA GCTGACAAGT ACCGCCTAAC ATATGCCTAC TTCGCTGGTG GGGATGCTGG 960
 AGATGCCTTT GATGGCTTTG ATTTTGGCGA TGATCCTAGT GACAAGTTTT TCACATCCCA 1020
 TAATGGCATG CAGTTCAGTA CCTGGGACAA TGACAATGAT AAGTTTGAAG GCAACTGTGC 1080
 TGAACAGGAT GGATCTGGTT GGTGGATGAA CAAGTGTAC GCTGGCCATC TCAATGGAGT 1140
 TTATTACCAA GGTGGCACTT ACTCAAAAGC ATCTACTCCT AATGGTTATG ATAATGGCAT 1200
 TATTTGGGCC ACTTGAAAA CCCGGTGGTA TTCCATGAAG AAAACCACTA TGAAGATAAT 1260
 CCCATTCAAC AGACTCACAA TTGGAGAAGG ACAGCAACAC CACCTGGGGG GAGCCAAACA 1320
 GGTCAGACCA GAGCACCTG CGGAAACAGA ATATGACTCA CTTTACCCTG AGGATGATTT 1380
 GTAGTAAGTC GACGGATCCG AATTCCG 1407

【書類名】 図面

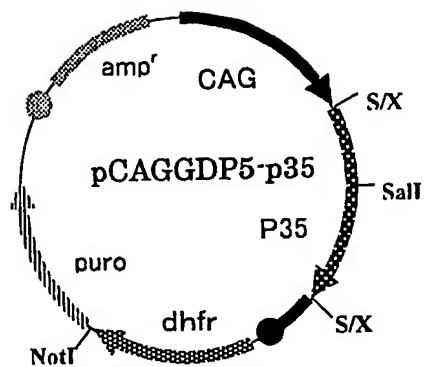
【図 1】



【図 2】

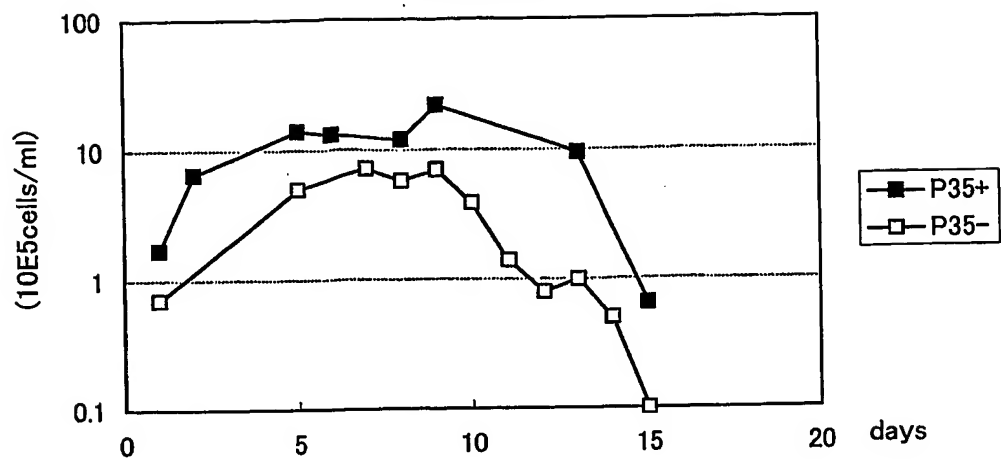


【図3】

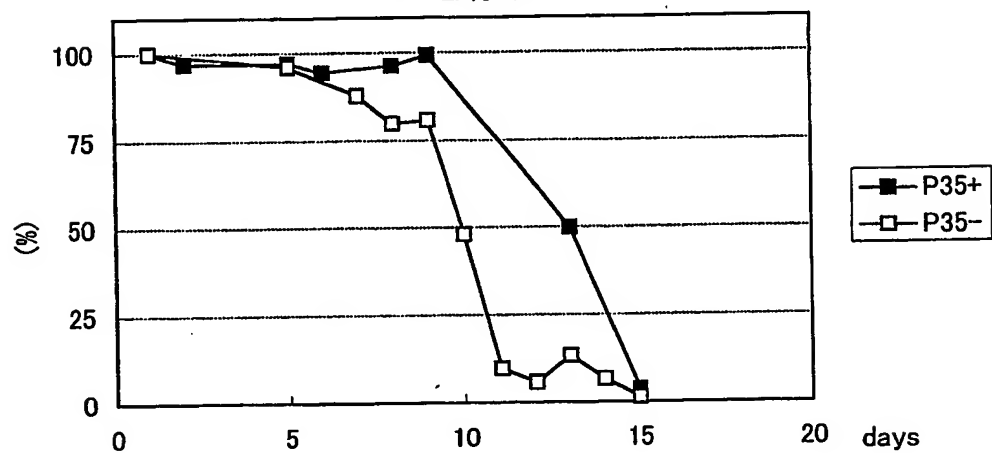


【図 4】

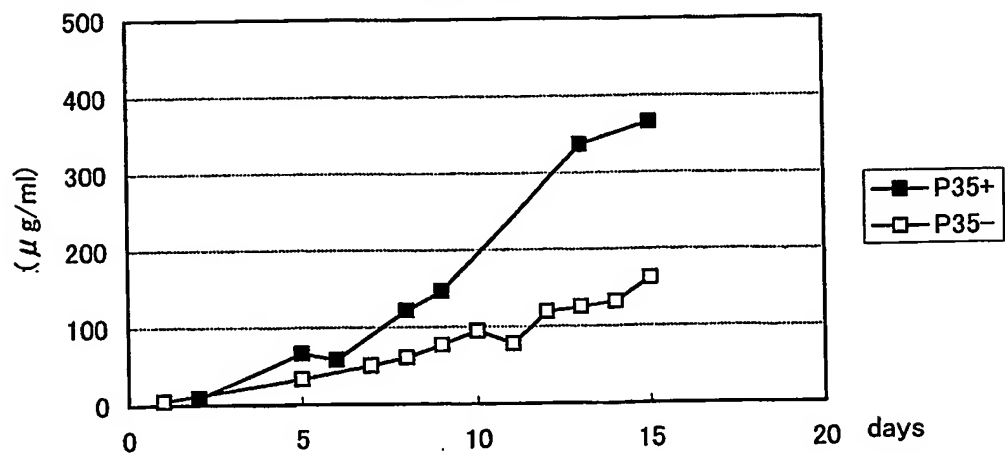
A. 生細胞数



B. 生存率

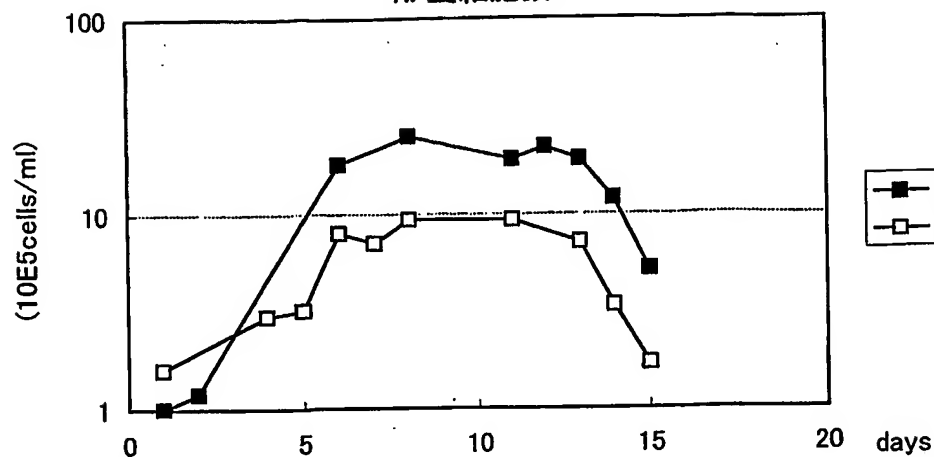


C. 産生量

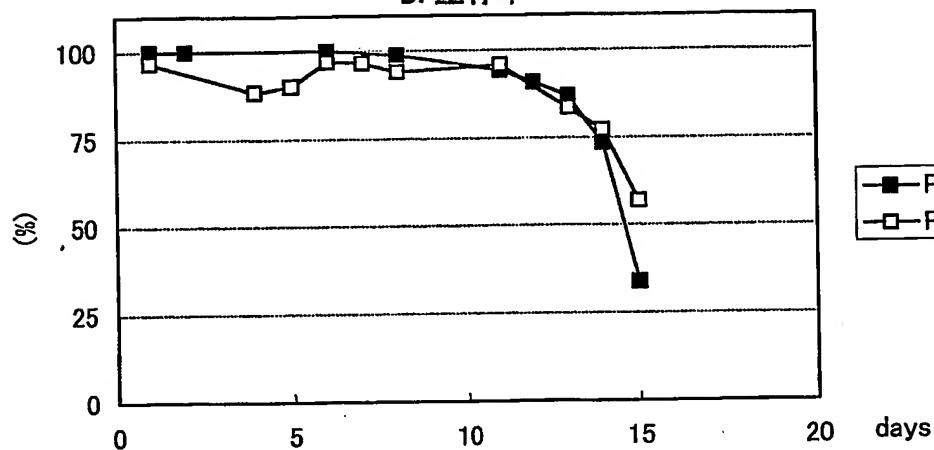


【図 5】

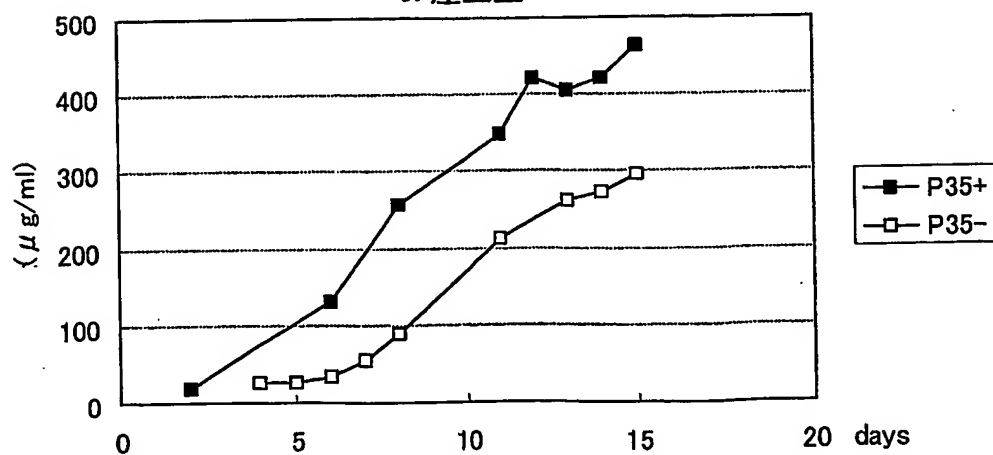
A. 生細胞数



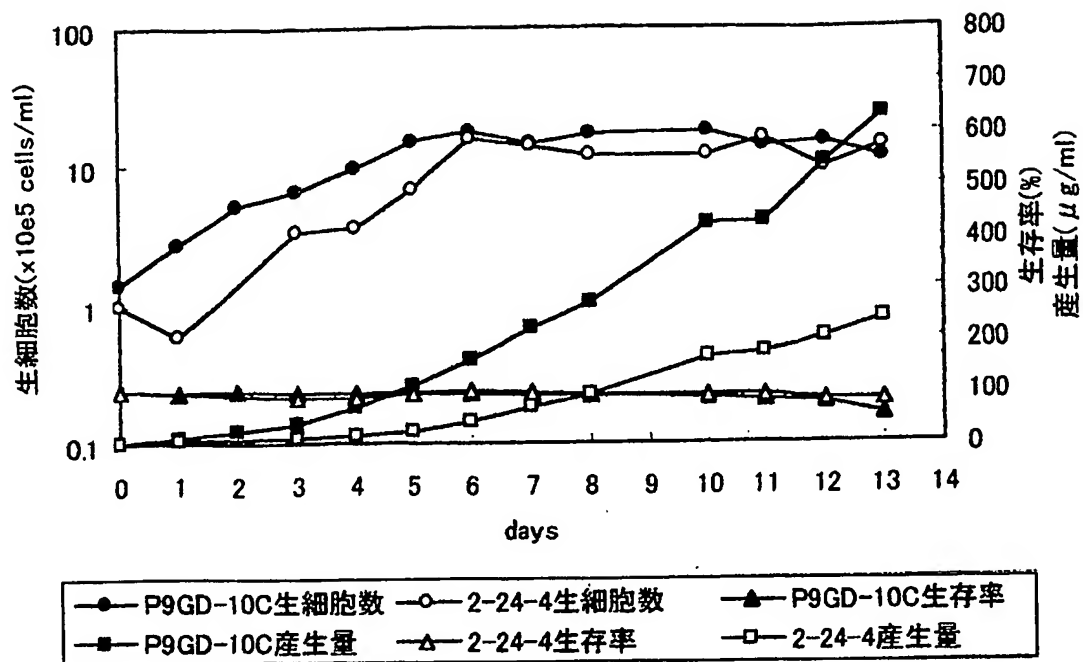
B. 生存率



C. 産生量



【図6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 フィブリノゲンを高発現する組換えフィブリノゲン高産生細胞及びその作製方法を提供する。

【解決手段】 フィブリノゲンを構成する3種のタンパク質、 α 鎖（もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖、 γ 鎖（もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を動物細胞に組み込む際に、それぞれの遺伝子の構成比を、 γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子が、 α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子に対して等量から1000倍量にする、さらにはバキュロウイルスP35遺伝子を用いて組換えフィブリノゲン高産生細胞を作製する。

【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-096215
受付番号	50400521549
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成16年 5月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 3月29日
-------	-------------

特願 2004-096215

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173555]

1. 変更年月日 1996年 3月 4日

[変更理由] 住所変更

住 所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
氏 名 財団法人化学及血清療法研究所